

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-97872

(P2001-97872A)

(43) 公開日 平成13年4月10日 (2001.4.10)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード(参考)
A 6 1 K 35/78		A 6 1 K 35/78	C 4 C 0 8 6
31/353		31/353	4 C 0 8 8
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1
審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 8 頁)			

(21) 出願番号	特願平11-279868	(71) 出願人	591045471 アビ株式会社 岐阜県岐阜市加納桜田町1丁目1番地
(22) 出願日	平成11年9月30日(1999.9.30)	(72) 発明者	三島 敏 岐阜市加納桜田町1丁目1番地 アビ 株 式会社内
		(72) 発明者	田中 英徳 岐阜市加納桜田町1丁目1番地 アビ 株 式会社内
		(72) 発明者	堀廻 博重 三重県安芸郡伊勢町南黒田554
		(74) 代理人	100068755 弁理士 原田 博宣 (外1名)
		最終頁に続く	

## (54) 【発明の名称】 赤ブドウ抽出物及びその製造方法

## (57) 【要約】

【課題】 ガン細胞に対して増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果を発揮することができるうえ、副作用を低減させることができる赤ブドウ抽出物及びその製造方法を提供する。

【解決手段】 赤ブドウ抽出物は、赤ブドウより抽出される有効成分を含有し、ガン細胞に対して、増殖抑制作用及びアポトーシス誘導作用から選ばれる少なくとも1種の作用を有するものである。前記有効成分はポリフェノールを主成分とするものである。この赤ブドウ抽出物は、赤ブドウを圧搾して果汁を取り除いた残渣に水を加え、攪拌しながら有効成分を抽出し、残渣を取り除くことによって製造される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 赤ブドウより抽出される有効成分を含有し、ガン細胞に対して、増殖抑制作用及びアポトーシス誘導作用から選ばれる少なくとも1種の作用を有することを特徴とする赤ブドウ抽出物。

【請求項2】 前記有効成分はポリフェノールを主成分とするものであることを特徴とする請求項1に記載の赤ブドウ抽出物。

【請求項3】 赤ブドウを圧搾して果汁を取り除いた残渣に水を加え、攪拌しながら有効成分を抽出し、残渣を取り除いたことを特徴とする赤ブドウ抽出物の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、ガンの治療や予防に効果を発揮することができる赤ブドウ抽出物及びその製造方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】現在、ガンは死亡原因のトップを占める病気であり、その予防や治療に対する人々の関心は非常に高まっている。しかしながら、Chabnerの統計によると47%は現在の医療では十分な治療を期待することができず、手術・放射線・化学療法のうち、延命に寄与する完全治療の割合は手術単独が約37%、放射線単独療法で約10%、化学療法では約5%に過ぎない。

【0003】近年、ガン治療別探索の中、アポトーシス、すなわちガン細胞自身の自滅に関する研究が盛んになりつつある。多細胞生物の細胞は、細胞分裂により増殖分化し、様々な機能を果たすだけでなく、自ら死ぬことができる。このいわば自殺ともいえる細胞死がアポトーシスと呼ばれるものである。

【0004】アポトーシスは、生物個体発生における組織・臓器の形成、生体の恒常性維持と防御に重要な働きを有しているだけでなく、多くの病気の発生と深い関わりがあることが解明されつつある。その一義的機能は、生体にとって好ましくない細胞の除去であり、生命はこの細胞に備わったアポトーシスという細胞除去機能によって支えられ守られている。

【0005】臨床において、アポトーシス研究の成果が最も待ち望まれている分野として悪性腫瘍疾患、脳神経疾患、種々の炎症性疾患（肝炎、腎炎等）等が挙げられる。特に、悪性腫瘍疾患及びその治療に関しては、上述したように治療法が十分ということもあり、基礎研究から臨床への早期の応用が期待されている。

【0006】アポトーシスによる細胞の制御機構の異常は、ガン形成の一つの原因であると考えられている。本来死滅すべき細胞がアポトーシスをつくり細胞死滅を起こさずとも生き残った場合、その細胞が様々な刺激を受けて染色体に変異を重ね、最終的にガン細胞になるとされている。つまり、ガン細胞は、このアポトーシスに対

する耐性機構を獲得して初めて、爆発的な増殖を可能にすることができるのである。このことから、種々の遺伝子変異を伴う細胞のガン化は、アポトーシスに対する耐性獲得の過程と密接な関係がある。

【0007】また、ガン化することが可能性が高い異常細胞に対する増殖抑制が、異常な遺伝子の増殖を抑制し、その遺伝子のさらなる突然変異を抑制して異常細胞の悪性化（ガン化）を防止することができるといえる考えに基づいて、それらの細胞に対し増殖抑制作用を有する物質及びその増殖抑制を誘導するための細胞内シグナル伝達系の研究が進められている。現在、それらのシグナル伝達系に関与する物質のうち幾つかは、アポトーシス誘導の際に発現される遺伝子やタンパク質と同じ物質であることが報告され、増殖抑制作用とアポトーシス誘導作用との密接な関係が指摘されている。

【0008】一方、発ガン予防の観点から、ガンの発生と、食品又は食生活との間に密接な関連があることが指摘されている。例えば、食習慣が喫煙とはほぼ同程度のガン発生要因を占めることや、カロリーや脂肪、塩分の過剰摂取や低繊維食等が、胃ガン、乳ガン、大腸ガン等の発生と密接に関係することが疫学的研究から示唆されている。普段の食生活において発ガン物質の摂取を回避し、発ガン抑制成分を含んだ食料を積極的に摂取することによって、ガンの発生を予防しようという健康意識の高まりから、食品中のガン予防に効果を発揮する有効物質が探索され、現在では、日常食されている食品の中からそれらの効果を有する物質が数多く発見されている。

【0009】これらガン予防に効果が期待される食品のうち、赤ワインが特に注目されている。従来より、赤ワインはアルコール飲料として摂取されてきたが、日本人は欧米人に比較してその摂取量が著しく少なかった。しかしながら、1990年以降「フレンチパラドックス」で始まった赤ワインブームの到来以来、日本人の健康意識と一致し、生理活性物質であるポリフェノールを主成分とした健康食品として摂取されるようになってきた。

【0010】この赤ワインへの関心が高まるにつれて、その効果効果についての研究が著しく活発化され、数多くの研究機関において、赤ワインに活性酸素消去能があることが確認されている。そして、この活性酸素消去能は、動脈硬化予防、視力改善、血中コレステロール低下、抗白内障、抗潰瘍作用等に寄与するものであると考えられている。この赤ワイン中の活性酸素消去能を有する生理活性物質はポリフェノールであるといわれ、この活性酸素消去能とポリフェノール含有量との間には高い相関関係が見出されている。

## 【0011】

【発明が解決しようとする課題】ところが、現在の医療技術では、ガンの完全治療を期待するのは非常に困難であり、その中でも特に進歩が期待される化学療法

は、多くの抗がん剤が正常細胞に対して細胞毒性を有していることから、効果の割に副作用が大きいという問題がある。

【0012】一方、前記赤ワインとガン予防の間には、生理活性物質であるポリフェノールと活性酸素消去能との相関関係による抗腫瘍作用が推測されているにとどまり、ガン細胞に対する増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果については、ほとんど研究は行われていない。

【0013】この発明は、上記のような従来技術に存在する問題点に着目してなされたものである。その目的とするところは、ガン細胞に対して増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果を発揮することができうるうえ、副作用を低減させることができる赤ブドウ抽出物及びその製造方法を提供することにある。

【0014】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成するために、請求項1に記載の発明の赤ブドウ抽出物は、赤ブドウより抽出される有効成分を含有し、ガン細胞に対して、増殖抑制作用及びアポトーシス誘導作用から選ばれた少なくとも1種の作用を有することを特徴とするものである。

【0015】請求項2に記載の発明の赤ブドウ抽出物は、請求項1に記載の発明において、前記有効成分はポリフェノールを主成分とするものであることを特徴とするものである。

【0016】請求項3に記載の発明の赤ブドウ抽出物の製造方法は、赤ブドウを圧搾して果汁を取り除いた残渣に水を加え、攪拌しながら有効成分を抽出し、残渣を取り除いたことを特徴とするものである。

【0017】

【発明の実施の形態】以下、この発明の実施形態を詳細に説明する。赤ブドウ抽出物は、赤ブドウより抽出される有効成分を含有し、ガン細胞に対して、増殖抑制作用及びアポトーシス誘導作用から選ばれた少なくとも1種の作用を有するものである。さらに、前記有効成分はポリフェノールを主成分とするものである。

【0018】前記赤ブドウより抽出される有効成分は、主として赤ブドウの果皮及び種に含有されている。また、この有効成分は、赤ブドウの果汁、果皮及び種を原料として作られる赤ブドウジュース及び赤ワイン中にも含有されている。なお、前記赤ブドウは、いずれの品種の赤ブドウであっても構わない。

【0019】この有効成分は、産業廃棄物として大量かつ安価に得られることから、赤ブドウジュース又は赤ワインを製造する際に果汁を搾汁した後の残渣（主として果皮及び種からなる）より抽出されたものであるのが好ましい。この残渣から抽出された有効成分は、果汁を構成する不要な成分がほとんど含まれていないことから、非常に高濃度の有効成分が含有されており、高濃度

かつ高純度の有効成分を含有する赤ブドウ抽出物を容易に製造することができる。

【0020】有効成分としてのポリフェノールは、芳香族炭化水素の2個以上の水素がヒドロキシ基で置換された化合物であり、活性酸素消去能があることが知られている。このポリフェノールは、主として植物の樹皮、表皮及び本部に多く含有されている。赤ブドウに含まれるポリフェノールとしては、例えば、モノマーポリフェノールとして、アントシアニン、カテキン、エピカテキン、ケルセチン等のフラボノイド類、ポリマーポリフェノールとしてプロアントシアニジン、タンニン等が挙げられる。

【0021】また、この赤ブドウ抽出物には、前記ポリフェノール以外にも、ガン細胞に対して増殖抑制作用及びアポトーシス誘導作用から選ばれた少なくとも1種の作用を有するごく微量の有効成分（以下、微量成分と記載する）が含有されている。この微量成分は、赤ブドウの果皮及び種から選ばれた少なくとも1種に含有されている未知の水溶性成分であると考えられる。さらに、この微量成分は、前記ポリフェノールと相互作用することによって、ガン細胞に対して増殖抑制効果及びアポトーシス誘導効果から選ばれた少なくとも1種の効果を発揮することができると推測される。

【0022】赤ブドウ抽出物中のポリフェノールの含有量は、乾燥させて粉末化したときに60～80重量%の範囲内であるのが好ましい。このポリフェノールの含有量が60重量%未満の場合には、ガン細胞に対する増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果が効果的に発揮されないおそれがある。逆に80重量%を超える場合には、前記微量成分の含有量が低下することから、ガン細胞に対する増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果が効果的に発揮されないおそれがある。

【0023】アポトーシス誘導作用は、前記有効成分がガン細胞に対し、そのガン細胞自身の死のプログラムを起動させて、自ら死に導かせるように働く作用である。このアポトーシスによる細胞死の主な形態学的特徴としては、細胞膜がほとんど破壊されない状態で細胞膜が小さく断片化されたアポトーシス小体形成されるとともに、細胞質及び染色体が断片化されて各アポトーシス小体内に含有されることが挙げられる。

【0024】また、アポトーシスの生化学的特徴としては、死細胞からDNAを抽出してアガロースゲルを用いて電気泳動したとき、染色体DNAがタクロソーム単位（約180塩基対の整数倍）に小さく断片化されたDNAラダーが見られることが挙げられる。この染色体DNAの断片化には種々のエンドヌクレアーゼが作用している。

【0025】この赤ブドウ抽出物は、粗抽出水溶液、粗抽出粉末、水溶性粉末、精製水溶液又は精製粉末のうちのいずれかの形態にすることができ、前記粗抽出水溶

液は赤ブドウの果皮及び種に含まれる有効成分を水で一度抽出した水溶液であり、粗抽出粉末はこの水溶液を乾燥させた粉末である。

【0026】また、水溶性粉末は前記粗抽出粉末にエタノールを加えて沈澱する成分を乾燥させた粉末であり、エタノール可溶性ポリフェノール等からなるエタノール溶解性成分が除去されている。このエタノール溶解性成分は、ガン細胞に対する増殖抑制作用及びアポトーシス誘導作用を有しない不要成分である。一方、精製水溶液は前記粗抽出粉末を再び水に溶解させ、水に不溶な成分をさらに除去した水溶液であり、精製粉末はこの精製水溶液を乾燥させた粉末である。

【0027】そして、これらの赤ブドウ抽出物は、ドリンク剤等に添加させて摂取するか、或いは食品添加物として食品に添加して摂取したりすることができる。また、粉末を原料として、例えば、打錠、ソフトカプセル、錠剤シロップ等の利用しやすい形態に加工して摂取することも可能である。

【0028】次に、上記赤ブドウ抽出物の作用について以下に記載する。この赤ブドウ抽出物を製造する場合には、まず、赤ブドウを破砕して果汁を圧搾し、果皮及び種よりなる残渣を得る。このとき、産業廃棄物として大量かつ安価に入手することができるところから、赤ブドウジュース又は赤ワインを製造する際に果汁を圧搾した後の残渣を用いるのが最も好ましい。

【0029】次に、この残渣に水を加えた後、攪拌しながら有効成分を抽出する。この抽出時の水温は20～50℃の範囲内であるのが好ましい。この水温が20℃未満の場合には、残渣中の有効成分が効率的に抽出されない。逆に50℃を超える場合には、有効成分としてのポリフェノールが酸化されて重合し、その活性が消失してガン細胞に対する増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果が十分に発揮されないおそれがある。また、以下に記載する作業において、有効成分の活性消失を抑制するために、50℃以下の温度で取り扱われるのが好ましい。

【0030】続いて、前記の残渣が懸濁された懸濁液をろ紙を用いてろ過し、残渣及び不溶解物を取り除くことによって、赤ブドウ抽出物の粗抽出水溶液が得られる。また、必要に応じて、遠心分離によって残渣及び不溶解物を取り除いてもよい。さらに、この粗抽出水溶液を乾燥させることによって、赤ブドウ抽出物の粗抽出粉末が得られる。前記乾燥方法としては、減圧濃縮法、減圧乾燥法及び凍結乾燥法から選ばれた少なくとも1種の方法が好適に用いられる。

【0031】また、赤ブドウ抽出物の水溶性粉末を製造する場合には、前記粗抽出粉末にエタノール又はエタノール水溶液からなる溶媒を添加した後、攪拌しながらその溶媒に不溶な成分を沈澱させ、その沈澱を減圧乾燥法又は凍結乾燥法を用いて乾燥させる。この溶媒中のエタ

ノール濃度は50～100容量%であるのが好ましい。この濃度が50容量%未満の場合には、エタノール溶解性成分を充分に除去することができない。さらに、このエタノール溶解性成分をより一層効率よく取り除くために、前記エタノール濃度は80～100容量%であるのがより好ましい。

【0032】さらに、赤ブドウ抽出物の精製水溶液を製造する場合には、前記粗抽出粉末に再び水を加えた後、攪拌しながら水に不溶な成分を沈澱させる。続いて、その沈澱をろ過及び遠心分離から選ばれる少なくとも1種の方法を用いて除去することによって、赤ブドウ抽出物の精製水溶液が得られる。さらに、この精製水溶液を減圧濃縮法、減圧乾燥法及び凍結乾燥法から選ばれた少なくとも1種の乾燥方法を用いて乾燥させることによって、赤ブドウ抽出物の精製粉末が得られる。

【0033】一方、赤ブドウジュース又は赤ワインより赤ブドウ抽出物を製造する場合には、赤ブドウジュース又は赤ワインを、減圧濃縮法、減圧乾燥法及び凍結乾燥法から選ばれた少なくとも1種の乾燥法を用いて粉末化させることによって、粗抽出粉末が得られる。さらに、上記と同様に、この粗抽出粉末からエタノール溶解性成分やその他余分な成分を取り除いたりして、水溶性粉末、精製水溶液又は精製粉末を製造してもよい。

【0034】さて、この赤ブドウ抽出物を経口摂取することによって、高濃度の有効成分が体内のガン細胞及びガン化する可能性が高い異常細胞に対して、増殖抑制効果及びアポトーシス誘導効果を発揮することができる。このとき、ガン細胞及び異常細胞の多くは、アポトーシス誘導作用により自ら死滅することによって増殖抑制に作用する。また、増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果のいずれか一方のみが発揮されることもある。

【0035】一方、この赤ブドウ抽出物の主成分は、活性酸素消去能を有するポリフェノールであることから、動脈硬化予防、視力改善、血中コレステロール低下、白内障予防等にも効果を発揮することができ、また、この赤ブドウ抽出物は、日常食されている食品である赤ブドウを原料として製造されていることから、大量に摂取した場合でも正常細胞に対する細胞毒性がほとんど見られない。

【0036】上記実施形態によって発揮される効果について、以下に記載する。

実施形態の赤ブドウ抽出物は、赤ブドウより抽出される有効成分を含有し、ガン細胞に対して、増殖抑制作用及びアポトーシス誘導作用から選ばれた少なくとも1種の作用を有するものである。このため、ガン細胞及びガン化する可能性が高い異常細胞に対して、増殖抑制効果及びアポトーシス誘導効果から選ばれた少なくとも1種の効果を確実に発揮することができる。さらに、この赤ブドウ抽出物は、日常食されている食品である赤ブドウを原料としていることから、正常細胞に対する副作用

を確実に低減させることができる。

【0037】従って、痛みを伴わない経口摂取により、ガンの治療を効果的に行うことができるうえ、ガン化す可能性の高い異常細胞にも効果を有することから、ガンの予防にも効果を発揮することができる。さらに、副作用がほとんどないことから、前記従来の抗ガン剤の場合のように投与量（摂取量）及び投与期間（摂取期間）を厳密に設定する必要がほとんどないことから大変便利である。

【0038】これに対して、前記従来の既存の抗ガン剤では、ガン細胞に対してアポトーシス誘導効果を発揮することができる一方で、正常細胞に対しても細胞毒性を有しており、その副作用による苦痛に耐えながら治療が行われていたことから、ガン患者にとっては非常に大きな負担となる治療法であった。

【0039】また、この赤ブドウ抽出物は、市販の飲料又はドリンク剤と同様の感覚で手軽に摂取することができるとともに、ビタミン剤のようにカプセルや錠剤シロップ等の意識的に摂取することができる形態で摂取することもできる。さらに、非常に安価に製造することができるうえ、副作用もほとんどないため、日常的及び継続的なガンの治療及び予防に最適である。

【0040】一方、この赤ブドウ抽出物と市販の赤ワインを比較した場合には、ガン細胞に対する増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果を確実に発揮させるための有効量は、有効成分の含有量が著しく低い通常の赤ワイン飲酒では到底摂取することが不可能であると考えられる。

【0041】赤ブドウ抽出物中の有効成分が生理活性物質であるポリフェノールを主成分とするものであることから、ガン細胞に対して増殖抑制効果及びアポトーシス誘導効果から認められる少なくとも1種の効果をより一層確実に発揮することができるうえ、副作用を確実に低減させることができる。さらに、ポリフェノールは活性酸素消去能も同時に有していることから、副作用を低減せつつ、動脈硬化予防、視力改善、血中コレステロール低下、白内障予防等にも効果を発揮することができる。

【0042】赤ブドウ抽出物中のポリフェノールの含有量を、乾燥させて粉末化したときに60〜80重量%の範囲内になるように調整することによって、ガン細胞に対して増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果を効果的に発揮することができる。さらに、赤ブドウ抽出物中に含有される微量成分の含有量を低下を抑制することができることから、前記の効果をより一層効果的に発揮することができる。

【0043】赤ブドウ抽出物中の有効成分が赤ブドウの果皮及び種に含有されていることから、赤ブドウジュース又は赤ワインを製造する際に発生する産業廃棄物である残渣を有効に利用して抽出することができる。こ

のため、非常に容易に大量入手することができるうえ、非常に安価に製造することができる。

【0044】赤ブドウの果皮及び種から有効成分を抽出することによって、赤ブドウの果汁に含まれる不要成分の混入がほとんどないことから、有効成分濃度を非常に高濃度にするることができる。このため、ガン細胞に対して増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果を発揮させることができる量の有効成分を容易かつ確実に摂取することができる。

【0045】水溶性粉末、精製水溶液又は精製粉末のいずれかの形態にすることによって、不要な成分であるとともに、ドリンク剤等に添加した場合には不溶解物生成の原因ともなる成分を効果的に取り除いた赤ブドウ抽出物を得ることができる。さらに、この赤ブドウ抽出物は、有効成分が高濃度かつ高純度に含有されていることから、その品質は非常に優れている。

【0046】赤ブドウを圧搾して果汁を取り除いた残渣に水を加え、攪拌しながら有効成分を抽出し、残渣を取り除くことにより赤ブドウ抽出物を製造することによって、ガン細胞に対して増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果を発揮することができるうえ、副作用を低減させることができる赤ブドウ抽出物を非常に容易に製造することができる。

【0047】有効成分を抽出する際の水温を20〜50℃とすることによって、有効成分を効率的に抽出することができるうえ、有効成分の活性の消失を確実に抑制することができる。

【0048】赤ブドウ抽出物の水溶性粉末を製造する際の溶媒中のエタノール濃度を50〜100重量%とすることによって、不要な成分であるとともに、ドリンク剤等に添加した場合には不溶解物生成の原因ともなるエタノール溶解性成分を効果的に取り除くことができる。このため、有効成分がより高濃度かつ高純度に含有された赤ブドウ抽出物を容易かつ確実に製造することができる。

【0049】赤ブドウ抽出物の精製水溶液又は精製粉末を製造することによって、ドリンク剤等に添加した場合には容易に不溶解物を生成しない高品質のドリンク剤等を製造することができる。

【0050】

【実施例】以下、上記実施形態を具体化した実施例及び比較例について説明する。

（実施例1）赤ブドウ果実（果皮、種及び果汁を含む）を破砕して圧搾し、果汁を取り除いた残渣に10倍量の水を添加し、40℃で3時間攪拌しながら有効成分を抽出した。この赤ブドウ残渣の懸濁液を遠心分離して上清を得た後、その上清をろ紙を用いて吸引ろ過した。この得られたろ液を40℃で減圧濃縮した後、凍結乾燥することによって赤ブドウ抽出物の粗抽出粉末を得た。（実施例2）実施例1で得られた粗抽出粉末に9.9%

タノールを10倍量添加した後、1時間攪拌することによって、エタノール不溶性の沈澱を生成させた。その沈澱を含むエタノール液を遠心分離した後、上清を除去して沈澱を得、その沈澱を減圧乾燥することによって赤ブドウ抽出物の水溶性粉末を得た。

(実施例3) 実施例1で得られた粗抽出粉末に10倍量の水を添加して1時間攪拌した。この水溶液を遠心分離して上清を得た後、その上清をろ紙を用いて吸引ろ過した。この得られたろ液を40℃で減圧濃縮した後、凍結乾燥することによって赤ブドウ抽出物の精製粉末を得た。

(比較例1) 滅菌蒸留水を比較例1とした。

(ヒト胃ガン細胞増殖抑制実験) 10%牛胎児血清含有RPMI培養液を満たした培養皿に培養ヒト胃ガン細胞を分注し、 $5 \times 10^5$ 細胞/mlの細胞密度になるように調整した。次に、実施例1〜3で得られた赤ブドウ抽出粉末の水溶液及び比較例1の滅菌蒸留水を前記細胞培養液中に添加した。

【0051】なお、各実施例で得られた粉末の最終濃度は、0.5mg/ml、1.0mg/ml、1.5mg/ml、2.0mg/mlである。そして、これらの細胞をインキュベーター(37℃、5%CO<sub>2</sub>)内で3日間培養しながら、1日ごとに生細胞数を計測した。続いて、実施例1〜3及び比較例1のヒト胃ガン細胞の増殖曲線を作製し、比較例1の増殖率を100%とした場合の各実施例の各種濃度における増殖率(%)を求めた。それらの結果を図1に示す。

【0052】図1に示されるように、実施例1〜3で得られた赤ブドウ抽出物は、対照群としての比較例1に比較して、有意にヒト胃ガン細胞の増殖を抑制したことが示された。

(ヒト胃ガン細胞の形態変化の観察) 前記ヒト胃ガン細胞増殖抑制実験終了後の細胞(比較例1のヒト胃ガン細胞及び実施例1の粗抽出粉末2.0mg/mlの濃度で処理したヒト胃ガン細胞)を色素染色し、顕微鏡で観察した。

【0053】その結果、実施例1の粗抽出粉末で処理したヒト胃ガン細胞では、比較例1のヒト胃ガン細胞に比べて、より多くの死細胞が観察された。さらに、実施例1の死細胞をより詳細に観察したところ、死細胞の細胞膜が小さく断片化された多数のアポトーシス体が観察されたのに対し、比較例1の死細胞では細胞の断片化はほとんど観察されなかった。

(ヒト胃ガン細胞DNAの電気泳動実験) 前記ヒト胃ガン細胞増殖抑制実験終了後の胃ガン細胞からDNAを抽出した後、アガロースゲル電気泳動を行ってDNAの断片化の有無を確認した。すなわち、比較例1のヒト胃ガン細胞培養液、並びに実施例1の粗抽出粉末1.0mg/ml及び2.0mg/mlの濃度で処理したヒト胃ガン細胞培養液を軽く遠心分離して上清を除去した後、残

った細胞ペレットをカルシウム不含リン酸緩衝液で1回洗浄した。

【0054】次に、前記各細胞ペレットに細胞融解用バッファを加えて細胞を融解させた後、RNAse溶液を添加して50℃、2.5時間反応させた後、プロテアーゼK溶液を加えて50℃、2.5時間反応させてから、DNAを抽出した。このDNA抽出液とゲルローディング液とを混合したものを、2%アガロースゲル板の各ウェルにローディングし、100Vの定電圧で電気泳動を行った。電気泳動終了後、UVトランスイルミネーターを用いて、エチジウムブロマイド蛍光を発するDNAを検出し、写真撮影した。

【0055】その結果、実施例1の2種類の濃度の粗抽出粉末で処理したヒト胃ガン細胞では、いずれもほぼヌクレオソーム単位に切断されたDNA断片(DNAラダー)が観察された。さらに、2.0mg/mlの濃度で処理したヒト胃ガン細胞培養液は、1.0mg/mlの濃度で処理したのもよりも、DNAラダーがより濃く染色されていた。一方、比較例1のヒト胃ガン細胞では、ウェルの近辺に非常に長いDNAが観察されたのみで、DNAの断片化は全く見られなかった。

【0056】従って、実施例1で得られた粗抽出粉末による増殖抑制効果の少なくとも一部は、ヒト胃ガン細胞に対するアポトーシス誘導効果に起因するものであることが確認された。また、このアポトーシス誘導効果は、濃度依存的に発現されるものであることも示された。

(成分分析) 実施例1で得られた赤ブドウ抽出物の粗抽出粉末について、アントシアニン含有量、プロアントシアニン含有量及び総ポリフェノール含有量を測定した。

【0057】その結果、この粗抽出粉末には、アントシアニン含有量が3.5重量%、プロアントシアニン含有量が60.0重量%、総ポリフェノール含有量が65.0重量%であったことが示された。

【0058】なお、上記実施形態は、次のように変更して具体化することも可能である。・水溶性粉末を水に溶解させ、水に不溶成分をさらに除去することによって、赤ブドウ抽出物を製造すること、或いは、精製粉末にエタノールを加えて沈澱する成分を乾燥させることによって、赤ブドウ抽出物を製造すること。

【0059】このように構成した場合、さらに高濃度かつ高純度の有効成分を含有する赤ブドウ抽出物を製造することができる。さらに、前記実施形態より把握できる技術的思想について以下に記載する。

【0060】(1) 前記有効成分は、赤ブドウの果皮及び種から選ばれる少なくとも1種より抽出されるものであることを特徴とする請求項1又は請求項2に記載の赤ブドウ抽出物。

【0061】このように構成した場合、有効成分の含有量を容易に高めることができる。

(2) 前記赤ブドウの果皮及び種から選ばれる少なくとも1種は、赤ブドウジュース又は赤ワインを製造する際に果汁を圧搾した後の残渣を使用することを特徴とする前記(1)に記載の赤ブドウ抽出物。

【0062】このように構成した場合、残渣を大量かつ安価に入手することができることから、赤ブドウ抽出物を安価に製造することができる。

(3) 前記ポリフェノールの含有量は、乾燥させて粉末化したときに60〜80重量%の範囲内であることを特徴とする請求項2、前記(1)及び前記(2)のいずれかに記載の赤ブドウ抽出物。

【0063】このように構成した場合、ガン細胞に対して増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果をより一層効果的に発揮させることができる。

(4) 赤ブドウに含有される水溶性の微量成分を含有することを特徴とする請求項2及び前記(1)から前記(3)のいずれかに記載の赤ブドウ抽出物。

【0064】このように構成した場合、ガン細胞に対して増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果をさらに効果的に発揮させることができる。

(5) 前記有効成分は、エタノール溶解性成分が除去されたポリフェノールを主成分とするものであることを特徴とする請求項1、請求項2及び前記(1)から前記(4)のいずれかに記載の赤ブドウ抽出物。

【0065】このように構成した場合、ドリンク剤等に添加した場合には不溶解物生成の原因となるエタノール溶解性成分を効果的に取り除くことができる。

(6) 前記有効成分は、水に不溶成分が除去され、水に溶解させたときに不溶解物が生成しないポリフェノールを主成分とするものであることを特徴とする請求項1、請求項2及び前記(1)から前記(5)のいずれかに記載の赤ブドウ抽出物。

【0066】このように構成した場合、ドリンク剤等に添加した場合には不溶解物生成の原因となる成分を効果的に取り除くことができる。

(7) 赤ブドウを圧搾して果汁を取り除いた残渣に水

を加え、攪拌しながら有効成分を抽出し、残渣を取り除いた後に乾燥して粉末化させ、その粉末にエタノールを加えて沈澱を生成させ、その沈澱を乾燥させたことを特徴とする赤ブドウ抽出物の製造方法。

【0067】このように構成した場合、ドリンク剤等に添加した場合には不溶解物生成の原因となるエタノール溶解性成分を効果的に取り除いた赤ブドウ抽出物を容易に製造することができる。

【0068】(8) 赤ブドウを圧搾して果汁を取り除いた残渣に水を加え、攪拌しながら有効成分を抽出し、残渣を取り除いた後に乾燥して粉末化させ、さらにその粉末に水を加えて攪拌し、不溶解物を除去した後に乾燥させたことを特徴とする赤ブドウ抽出物の製造方法。

【0069】このように構成した場合、ドリンク剤等に添加した場合には不溶解物生成の原因となる成分を効果的に取り除いた赤ブドウ抽出物を容易に製造することができる。

【0070】

【発明の効果】以上詳述したように、この発明によれば、次のような効果を奏する。請求項1に記載の発明の赤ブドウ抽出物によれば、ガン細胞に対して増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果を発揮することができるうえ、副作用を低減させることができる。

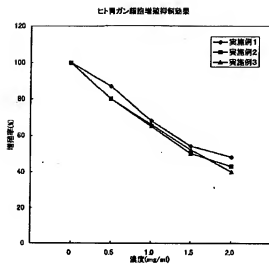
【0071】請求項2に記載の発明の赤ブドウ抽出物によれば、請求項1に記載の発明の効果に加えて、ガン細胞に対して増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果をより効果的に発揮させることができる。

【0072】請求項3に記載の発明の赤ブドウ抽出物の製造方法によれば、ガン細胞に対して増殖抑制効果又はアポトーシス誘導効果を発揮することができるうえ、副作用を低減させることができる赤ブドウ抽出物を容易に製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒト胃ガン細胞増殖抑制試験の結果を示すグラフ。

【図1】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 AA04 BA08 GA17  
 MA01 MA04 NA06 NA14 ZB26  
 ZC41  
 4C088 AB56 AC04 BA09 BA11 CA02  
 MA01 NA06 NA14 ZB26 ZC41

*electronic translation***PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : 2001-097872

(43)Date of publication of application : 10.04.2001

(51)Int.Cl.

A61K 35/78  
A61K 31/353  
A61P 35/00  
A61P 43/00

(21)Application number : 11-279868

(71)Applicant : API CO LTD

(22)Date of filing : 30.09.1999

(72)Inventor : MISHIMA SATOSHI

TANAKA YOSHIO

HIMAWARI HIROSHIGE

(54) RED WINE EXTRACT AND METHOD OF ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a red grape extract capable of exhibiting proliferation suppressing effect and apoptosis induction effect on cancer cells, and further capable of reducing side effects, and to provide a method of its production.

SOLUTION: This red grape extract contains an active ingredient extracted from red grape, and has at least one effect selected from the proliferation suppressing effect and the apoptosis induction effect on cancer cells. The active ingredient contains a polyphenol as a main component. The red grape extract is produced by removing fruit juice by pressing the red grape, adding water to the obtained residue in the previous step, extracting the active ingredient while stirring the mixture and removing the residue.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

16.06.2006

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the red grape extract which can demonstrate effectiveness to the therapy and prevention of a gun, and its manufacture approach.

[0002]

[Description of the Prior Art] People's interest [ as opposed to / it is sick and / the prevention or therapy ] to which current and a gun occupy the top of a cause of death is increasing very much. However, as for the rate of the complete cure which cannot expect recovery sufficient by the present medicine 47% according to statistics of Chabner, but contributes to the prolongation of life among an operation, a radiation, and a chemotherapy, an operation independent is only about 5% about 10% in a radiation independent therapy about 37% at a chemotherapy.

[0003] In recent years, the research on self-destruction of apoptosis (i.e., the gun cell itself) is prospering in a gun therapy agent pursuit. Growth differentiation of the cell of a multicellular organism can be carried out by cell division, and it not only achieves various functions, but it can die itself. This cell death that can be said also as suicide so to speak is called apoptosis.

[0004] It is being solved apoptosis not only has work important for formation of an organization and an organ, and the constant maintenance and defense of a living body in bion generating, but that has the deep relation with many sick generating. That most important function is removal of the cell which is not desirable for a living body, and the life is supported and kept by the cell removal function of the apoptosis with which this cell was equipped.

[0005] In clinical, a malignant tumor disease, a cranial nerve disease, various inflammatory diseases (hepatitis, nephritis, etc.), etc. are mentioned as a field which waits eagerly for the result of apoptosis research most. Since it says especially that a cure is inadequate with having mentioned above about a malignant tumor disease and its therapy, early application clinical from a fundamental research is expected.

[0006] It is thought that the abnormalities of the controlling mechanism of the cell by apoptosis are one cause of gun formation. When it survives without the cell which should become extinct essentially starting apoptosis, i.e., cell extinction, in response to the stimulus with the various cells, variation is repeated for a chromosome, and it is supposed that it will finally become a gun cell. That is, a gun cell can enable explosive growth only after it can gain the resistant mechanism to this apoptosis. From this, gun-ization of the cell accompanied by various gene variation has the close relation to the process of acquisition of resistance over apoptosis.

[0007] Moreover, research of the intracellular signaling system for guiding the matter which has growth depressant action to those cells, and its growth control based on the idea that the growth control to an abnormal cell with high possibility of gun-izing can control growth of an unusual gene, can control the further mutation of the gene, and can prevent the malignant alteration (gun-izing) of an abnormal cell is advanced. Among the matter which participates in current and those signal transfer systems, it is reported that some are the same matter as the gene and protein which are discovered in the case of

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The red grape extract characterized by having at least one sort of operations which contain the active principle extracted from a red grape, and are chosen from growth depressant action and an apoptosis induction operation to a gun cell.

[Claim 2] Said active principle is a red grape extract according to claim 1 characterized by being what uses polyphenol as a principal component.

[Claim 3] The manufacture approach of the red grape extract characterized by having extracted the active principle, adding and agitating water to the residue which squeezed the red grape and removed fruit juice, and removing residue.

---

[Translation done.]

apoptosis induction, and the close relation between growth depressant action and an apoptosis induction operation is pointed out.

[0008] It is pointed out that close relation is between generating of a gun, and food or eating habits from a viewpoint of \*\* gun prevention on the other hand. For example, it is suggested from epidemiological research that occupying a gun generating factor with eating habits almost comparable as smoking, a calorie, a fat, superfluous intake, low fiber diet of salinity, etc. are closely related to generating of a stomach gun, a breast cancer, a large intestine gun, etc. By avoiding intake of a carcinogen in usual eating habits, and taking in positively the meal material containing a \*\* gun control component, it searches for the effective matter which demonstrates effectiveness to the gun prevention in food from a rise of the health consciousness that generating of a gun will be prevented, and many matter which has those effectiveness out of the food eaten every day is discovered by current.

[0009] Especially red wine attracts attention among the food with which effectiveness is expected from these gun prevention. Although red wine had been conventionally taken in as an alcoholic beverage, Japanese people had little the intake remarkably as compared with Europeans and Americans. However, in accordance with Japanese health consciousness, it has come to be taken in as health food which used as the principal component the polyphenol which is a physiological active substance since arrival of the red wine drinking boom which started in "French paradox" in 1990 and afterwards.

[0010] The research on that efficacy effectiveness is activated remarkably, and it is checked in much research facilities that active oxygen elimination ability is in red wine as the interest about this red wine increases. And it is thought that this active oxygen elimination ability is what contributes to arteriosclerosis prevention, an eyesight improvement, a blood cholesterol level fall, an anti-cataract, an antiulcer action, etc. The high correlation is found out between the flume crack whose physiological active substance which has the active oxygen elimination ability in this red wine is polyphenol, this active oxygen elimination ability, and a polyphenol content.

[0011]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, in the current iatrotechnique, it is very difficult to expect the complete cure of a gun, and since many carcinostatic substances have cytotoxicity also to the normal cell, the present condition of a chemotherapy that an advance is expected also especially in it has the problem that a side effect is large considering effectiveness.

[0012] on the other hand, between said red wine and gun prevention, the antitumor action by the correlation of the polyphenol and active oxygen elimination ability which are a physiological active substance is guessed -- \*\*\*\* -- it remains and research is hardly done about the growth depressor effect or apoptosis inductive effect to a gun cell.

[0013] This invention is made paying attention to the trouble which exists in the above conventional techniques. The place made into the purpose is to offer a red [ who can reduce a side effect ] grape extract, and its manufacture approach, in being able to demonstrate growth depressor effect or apoptosis inductive effect to a gun cell.

[0014]

[Means for Solving the Problem] In order to attain the above-mentioned purpose, the red grape extract of invention according to claim 1 contains the active principle extracted from a red grape, and is characterized by having at least one sort of operations chosen from growth depressant action and an apoptosis induction operation to a gun cell.

[0015] The red grape extract of invention according to claim 2 is characterized by said active principle being what uses polyphenol as a principal component in invention according to claim 1.

[0016] The manufacture approach of the red grape extract invention according to claim 3 extracts an active principle, adding and agitating water to the residue which squeezed the red grape and removed fruit juice, and is characterized by removing residue.

[0017]

[Embodiment of the Invention] Hereafter, the operation gestalt of this invention is explained to a detail. A red grape extract contains the active principle extracted from a red grape, and has at least one sort of operations chosen from growth depressant action and an apoptosis induction operation to a gun cell.

Furthermore, said active principle uses polyphenol as a principal component.

[0018] The active principle extracted from said red grape is contained mainly as the pericarp and the kind of a red grape. Moreover, this active principle contains the fruit juice, the pericarp, and the kind of a red grape also in the red grape juice made as a raw material, and red wine. In addition, said red grape may be a red grape of which form.

[0019] Since it is obtained in large quantities as industrial waste, and cheaply, in case this active principle manufactures red grape juice or red wine, it is desirable to be extracted from the residue (for it to mainly consist of pericarp and a kind) after carrying out the juice of the fruit juice. In the active principle extracted from this residue, the red grape extract which the very high-concentration active principle contains and contains the active principle of high concentration and a high grade from the unnecessary component which constitutes fruit juice hardly containing can be manufactured easily.

[0020] The polyphenol as an active principle is the compound by which two or more hydrogen of aromatic hydrocarbon was permuted with hydroxyl, and it is known that there is active oxygen elimination ability. Many this polyphenol in a bark, vegetable epidermis, and vegetable headquarters is mainly contained. As polyphenol contained in a red grape, a pro anthocyanidin, tannin, etc. are mentioned as flavonoids, such as an anthocyanin, a catechin, epicatechin, and quercetine, and polymer polyphenol, for example as monomer polyphenol.

[0021] moreover, in this red grape extract, it has at least one sort of operations chosen from growth depressant action and an apoptosis induction operation to a gun cell besides said polyphenol -- the active principle (it is hereafter indicated as a minor constituent) of a minute amount contains very much. It is thought that this minor constituent is strange water-soluble materials contained in at least one sort chosen from the pericarp and the kind of a red grape. Furthermore, it is surmised that this minor constituent is what can demonstrate at least one sort of effectiveness chosen from growth depressor effect and apoptosis inductive effect to a gun cell by interacting with said polyphenol.

[0022] When it is made to dry and disintegration of the content of the polyphenol in a red grape extract is carried out, it is desirable that it is 60 - 80% of the weight of within the limits. When the content of this polyphenol is less than 60 % of the weight, there is a possibility that the growth depressor effect or apoptosis inductive effect to a gun cell may not be demonstrated effectively. Conversely, in exceeding 80 % of the weight, since the content of said minor constituent falls, there is a possibility that the growth depressor effect or apoptosis inductive effect to a gun cell may not be demonstrated effectively.

[0023] An apoptosis induction operation is an operation committed so that said active principle may make the program of death of a gun cell own [ the ] exercise, may die itself and may make it lead to a gun cell. While the apoptotic body by which the cell membrane was small fragmented in the condition that a cell membrane is hardly destroyed, as main morphological descriptions of the cell death by this apoptosis is formed, cytoplasm and a chromosome being fragmented and containing in each apoptotic body is mentioned.

[0024] Moreover, when DNA is extracted from a dead cell and electrophoresis is carried out as a biochemical description of apoptosis using agarose gel, it is mentioned that the DNA ladder by which Chromosome DNA was small fragmented per nucleosome (integral multiple of about 180 base pairs) is seen. Various endonucleases are acting on fragmentation of this chromosome DNA.

[0025] This red grape extract can be made into the gestalt of the rough extract water solution, rough extract powder, water-soluble powder, a purified water solution, or the purification powder. Said rough extract water solution is a water solution which extracted with water the active principle contained in the pericarp and the kind of a red grape once, and rough extract powder is powder which dried this water solution.

[0026] Moreover, water-soluble powder is powder which dried the component which adds ethanol to said rough extract powder, and precipitates, and the ethanol solubility component which consists of ethanol fusibility polyphenol etc. is removed. This ethanol solubility component is an unnecessary component which does not have the growth depressant action and the apoptosis induction operation over a gun cell. On the other hand, a purified water solution is a water solution from which said rough extract powder was again dissolved in water, and the insoluble component was further removed in water, and

purification powder is powder which dried this purified water solution.

[0027] And drinkable preparations etc. can be made to be able to add, and these red grape extracts can be taken in, or can be added and taken in for food as a food additive. Moreover, it is also possible to process the gestalt which is [ syrup / a making tablet a software capsule, / tablet ] easy to use by using powder as a raw material, and to take in.

[0028] Next, an operation of the above-mentioned red grape extract is indicated below. In manufacturing this red grape extract, first, a red grape is crushed, fruit juice is squeezed, and it obtains the residue which consists of pericarp and a kind. At this time, since it can obtain in large quantities as industrial waste, and cheaply, in case red grape juice or red wine is manufactured, it is most desirable to use the residue after squeezing fruit juice.

[0029] Next, after adding water to this residue, an active principle is extracted, stirring. As for the water temperature at the time of this extract, it is desirable that it is within the limits of 20-50 degrees C. When this water temperature is less than 20 degrees C, the active principle in residue is not extracted efficiently. Conversely, in exceeding 50 degrees C, the polyphenol as an active principle oxidizes and carries out a polymerization, and there is a possibility that the activity may disappear and the growth depressor effect or apoptosis inductive effect to a gun cell may not fully be demonstrated. Moreover, in the activity indicated below, in order to control activity disappearance of an active principle, it is desirable to be dealt with at the temperature of 50 degrees C or less.

[0030] Then, the rough extract water solution of a red grape extract is \*\*\*\*\* by filtering the suspension which the aforementioned residue suspended using a filter paper, and removing residue and a non-melt. Moreover, residue and a non-melt may be removed according to centrifugal separation if needed. Furthermore, the rough extract powder of a red grape extract is obtained by drying this rough extract water solution. As said desiccation approach, at least one sort of approaches chosen from a vacuum concentration method, a reduced-pressure-drying method, and a freeze drying method are used suitably.

[0031] Moreover, stirring, an insoluble component is settled to the solvent and it is made to dry the precipitation using a reduced-pressure-drying method or a freeze drying method, after adding the solvent which becomes said rough extract powder from ethanol or an ethanol water solution, in manufacturing the water-soluble powder of a red grape extract. As for the ethanol concentration in this solvent, it is desirable that it is 50 to 100 capacity %. When this concentration is under 50 capacity %, an ethanol solubility component cannot fully be removed. Furthermore, in order to remove this ethanol solubility component much more efficiently, as for said ethanol concentration, it is more desirable that it is 80 to 100 capacity %.

[0032] Furthermore, in manufacturing the purified water solution of a red grape extract, after adding water again to said rough extract powder, it settles an insoluble component in water, agitating. Then, the purified water solution of a red grape extract is obtained by removing the precipitation using at least one sort of approaches chosen from filtration and centrifugal separation. Furthermore, the purification powder of a red grape extract is obtained by drying this purified water solution using at least one sort of desiccation approaches chosen from a vacuum concentration method, a reduced-pressure-drying method, and a freeze drying method.

[0033] On the other hand, when manufacturing a red grape extract from red grape juice or red wine, rough extract powder is obtained by carrying out disintegration of red grape juice or the red wine using the method of drying at least one sort chosen from a vacuum concentration method, a reduced-pressure-drying method, and a freeze drying method. Furthermore, like the above, in addition to this, an ethanol solubility component and an excessive component may be removed from this rough extract powder, and water-soluble powder, a purified water solution, or purification powder may be manufactured.

[0034] Now, a high-concentration active principle can demonstrate growth depressor effect and apoptosis inductive effect by carrying out the ingestion of this red grape extract to a gun cell in the living body and an abnormal cell with high possibility of gun-izing. At this time, many of gun cells and abnormal cells act on growth control by becoming extinct oneself according to an apoptosis induction operation. Moreover, either growth depressor effect or apoptosis inductive effect may be demonstrated.

[0035] On the other hand, since the principal component of this red grape extract is polyphenol which has active oxygen elimination ability, it can demonstrate effectiveness to arteriosclerosis prevention, an eyesight improvement, a blood cholesterol level fall, cataract prevention, etc. Moreover, even when this red grape extract takes in the red grape which is the food eaten every day in large quantities from being manufactured as a raw material, the cytotoxicity over a normal cell is hardly seen.

[0036] The effectiveness demonstrated according to the above-mentioned operation gestalt is indicated below.

- The red grape extract of an operation gestalt contains the active principle extracted from a red grape, and has at least one sort of operations chosen from growth depressant action and an apoptosis induction operation to a gun cell. For this reason, at least one sort of effectiveness chosen from growth depressor effect and apoptosis inductive effect to a gun cell and an abnormal cell with high possibility of gun-izing can be demonstrated certainly. Furthermore, since this red grape extract is using as the raw material the red grape which is the food eaten every day, it can reduce the side effect over a normal cell certainly.

[0037] Therefore, by the ingestion without a pain, in being able to treat a gun effectively, since it has effectiveness also in the high abnormal cell of possibility of gun-izing, effectiveness can be demonstrated also to prevention of a gun. Furthermore, since there is almost no side effect, it is very convenient from there being almost no need of setting up strictly a dose (intake) and an administration period (intake period) like [ in the case of said conventional anticancer agent ].

[0038] On the other hand, since the therapy was performed in said conventional existing anticancer agent, having cytotoxicity also to the normal cell and bearing the pain by the side effect while apoptosis inductive effect could be demonstrated to the gun cell, for the gun patient, it was a cure used as a very big burden.

[0039] Moreover, this red grape extract can also be taken in with the gestalt which can be taken in intentionally [ a capsule tablet syrup, etc. ] like a vitamin compound while being able to take in it easily with the same feeling as a commercial drink or drinkable preparations. Furthermore, in being able to manufacture very cheaply, since there is also almost no side effect, it is the the best for the therapy and prevention of an everyday and continuous gun.

[0040] On the other hand, when this red grape extract is compared with commercial red wine, it is thought that the effective dose for demonstrating certainly the growth depressor effect or apoptosis inductive effect to a gun cell cannot simply be taken in by the content of an active principle by the remarkable low usual red wine drinking.

[0041] - Since the active principle in a red grape extract uses as a principal component the polyphenol which is a physiological active substance, in being able to demonstrate much more certainly at least one sort of effectiveness chosen from growth depressor effect and apoptosis inductive effect to a gun cell, a side effect can be reduced certainly. Furthermore, it can demonstrate effectiveness to arteriosclerosis prevention, an eyesight improvement, a blood cholesterol level fall, cataract prevention, etc., reducing a side effect, since polyphenol also has active oxygen elimination ability in coincidence.

[0042] - When it is made to dry and disintegration of the content of the polyphenol in a red grape extract is carried out, growth depressor effect or apoptosis inductive effect can be effectively demonstrated to a gun cell by preparing so that it may become 60 - 80% of the weight of within the limits. Furthermore, the aforementioned effectiveness can be demonstrated much more effectively from the ability of the fall of the content of the minor constituent contained in a red grape extract to be controlled.

[0043] - Since the active principle in a red grape extract contains as the pericarp and the kind of a red grape, it can extract using effectively the residue which is the industrial waste generated in case red grape juice or red wine is manufactured. For this reason, in being able to carry out extensive acquisition very easily, it can manufacture very cheaply.

[0044] - Since there is almost no mixing of the unnecessary component contained in the fruit juice of a red grape by extracting an active principle from the pericarp and the kind of a red grape, active principle concentration can be made very much into high concentration. For this reason, the active principle of an amount which can demonstrate growth depressor effect or apoptosis inductive effect to a gun cell can be taken in easily and certainly.

[0045] - While being an unnecessary component by making it the gestalt of either water-soluble powder, a purified water solution or purification powder, when it adds to drinkable preparations etc., the red grape extract with which the cause of non-melt generation removed the component effectively can be obtained. Furthermore, since the active principle contains this red grape extract in high concentration and a high grade, that quality is very excellent.

[0046] - In being able to demonstrate growth depressor effect or apoptosis inductive effect to a gun cell by extracting an active principle and manufacturing a red grape extract by removing residue, adding and agitating water to the residue which squeezed the red grape and removed fruit juice, a red [ who can reduce a side effect ] grape extract can be manufactured very easily.

[0047] - In being able to extract an active principle efficiently by making the water temperature at the time of extracting an active principle into 20-50 degrees C, disappearance of the activity of an active principle can be controlled certainly.

[0048] - While being an unnecessary component by making ethanol concentration in the solvent at the time of manufacturing the water-soluble powder of a red grape extract into 50 to 100 capacity %, when it adds to drinkable preparations etc., the cause of non-melt generation can remove an ethanol solubility component effectively. For this reason, an active principle can manufacture easily and certainly the red grape extract contained more in high concentration and a high grade.

[0049] - By manufacturing the purified water solution or purification powder of a red grape extract, when it adds to drinkable preparations etc., the drinkable preparations of the high quality which does not generate a non-melt easily etc. can be manufactured.

[0050]

[Example] Hereafter, the example and the example of a comparison which materialized the above-mentioned operation gestalt are explained.

(Example 1) Red grape fruits (pericarp, a kind, and fruit juice are included) were crushed and squeezed, the water of an amount was added 10 times to the residue which removed fruit juice, and the active principle was extracted, stirring at 40 degrees C for 3 hours. After carrying out centrifugal separation of the suspension of this red grape residue and obtaining supernatant liquid, suction filtration of that supernatant liquid was carried out using the filter paper. After carrying out vacuum concentration of this obtained filtrate at 40 degrees C, the rough extract powder of a red grape extract was obtained by freeze-drying.

(Example 2) The rough extract powder obtained in the example 1 was made to generate precipitation of ethanol insolubility by stirring for 1 hour after carrying out amount addition of the ethanol 10 times 99%. After carrying out centrifugal separation of the ethanol liquid including the precipitation, supernatant liquid was removed, precipitation was obtained and the water-soluble powder of a red grape extract was obtained by carrying out reduced pressure drying of the precipitation.

(Example 3) The water of an amount was added 10 times to the rough extract powder obtained in the example 1, and it stirred to it for 1 hour. After carrying out centrifugal separation of this water solution and obtaining supernatant liquid, suction filtration of that supernatant liquid was carried out using the filter paper. After carrying out vacuum concentration of this obtained filtrate at 40 degrees C, the purification powder of a red grape extract was obtained by freeze-drying.

(Example 1 of a comparison) Sterile distilled water was made into the example 1 of a comparison. (Homo sapiens stomach gun cytostatic experiment) The culture Homo sapiens stomach gun cell was poured distributively to the culture plate which filled fetal-calf-serum content RPMI culture medium 10%, and it prepared so that it might become  $5 \times 10^5$  cells / cell density of ml. Next, the water solution of the red grape extract powder obtained in the examples 1-3 and the sterile distilled water of the example 1 of a comparison were added in said cell culture liquid.

[0051] In addition, the last concentration of the powder obtained in each example is 0.5mg [ ml ] /, 1.0mg [ ml ] /, 1.5mg [ ml ] /, and 2.0mg/ml. And the viable count was measured day by day [ 1 ], cultivating these cells for three days within an incubator (37 degrees C, 5%CO<sub>2</sub>). Then, the proliferation profile of the Homo sapiens stomach gun cell of examples 1-3 and the example 1 of a comparison was produced, and the reproductive rate (%) in the various concentration of each example at the time of

making the reproductive rate of the example 1 of a comparison into 100% was searched for. Those results are shown in drawing 1.

[0052] As shown in drawing 1, it was shown that the red grape extract obtained in the examples 1-3 controlled growth of a Homo sapiens stomach gun cell intentionally as compared with the example 1 of a comparison as a control group.

(Observation of gestalt change of a Homo sapiens stomach gun cell) Coloring matter dyeing of the cell after said Homo sapiens stomach gun cytostatic experiment termination (Homo sapiens stomach gun cell processed by the concentration of the Homo sapiens stomach gun cell of the example 1 of a comparison and 2.0mg/ml of rough extract powder of an example 1) was carried out, and it observed under the microscope.

[0053] Consequently, in the Homo sapiens stomach gun cell processed with the rough extract powder of an example 1, more dead cells were observed compared with the Homo sapiens stomach gun cell of the example 1 of a comparison. Furthermore, when the dead cell of an example 1 was observed more in the detail, by the dead cell of the example 1 of a comparison, most fragmentation of a cell was not observed to the apoptotic body of a large number by which the cell membrane of a dead cell was fragmented small having been observed.

(Electrophoresis experiment of the Homo sapiens stomach gun cell DNA) After extracting DNA from the stomach gun cell after said Homo sapiens stomach gun cytostatic experiment termination, agarose gel electrophoresis was performed and the existence of fragmentation of DNA was checked. That is, after carrying out centrifugal separation of the Homo sapiens stomach gun cell culture liquid of the example 1 of a comparison, and the Homo sapiens stomach gun cell culture liquid processed in the list by the rough extract powder of 1.0mg/ml of an example 1, and the concentration of 2.0mg/ml lightly and removing supernatant liquid, the calcium non-phosphorus-containing acid buffer solution washed the cell pellet which remained once.

[0054] Next, DNA was extracted, after having added the RNase solution after adding the buffer for cytolyses to said each cell pellet and dissolving a cell, making 50 degrees C react for 2.5 hours, adding a protease K solution and making 50 degrees C react for 2.5 hours. Loading of what mixed this DNA extract and gel loading liquid was carried out to each well of an agarose gel plate 2%, and electrophoresis was performed by the constant voltage of 100V. A photograph of DNA which emits ethidium-bromide fluorescence was detected and taken after electrophoresis termination using UV Tran Swi Rumi Noether.

[0055] Consequently, in the Homo sapiens stomach gun cell processed with the rough extract powder of two kinds of concentration of an example 1, the DNA fragment (DNA ladder) with which all were mostly cut per nucleosome was observed. Furthermore, rather than what was processed by the concentration of 1.0mg/ml, a DNA ladder is deeper and the Homo sapiens stomach gun cell culture liquid processed by the concentration of 2.0mg/ml was dyed. On the other hand, in the Homo sapiens stomach gun cell of the example 1 of a comparison, very long DNA was observed in the neighborhood of a well, and fragmentation of DNA was not seen at all by request.

[0056] Therefore, it was checked that a part of growth depressor effect [ at least ] by the rough extract powder obtained in the example 1 is a thing resulting from the apoptosis inductive effect to a Homo sapiens stomach gun cell. Moreover, it was also shown that this apoptosis inductive effect is what is demonstrated by the concentration dependence target.

(Component analysis) About the rough extract powder of the red grape extract obtained in the example 1, the anthocyanin content, the pro anthocyanidin content, and the total polyphenol content were measured.

[0057] Consequently, it was shown in this rough extract powder that 3.5 % of the weight and a pro anthocyanidin content were [ 60.0 % of the weight and the total polyphenol content ] 65.0 % of the weight for the anthocyanin content.

[0058] In addition, it changes as follows and the above-mentioned operation gestalt can also take shape.

- Manufacture a red grape extract by dissolving water-soluble powder in water and removing an insoluble component further in water. Or manufacture a red grape extract by drying the component

which adds ethanol to purification powder and precipitates.

[0059] Thus, when constituted, the red grape extract which contains the active principle of high concentration and a high grade further can be manufactured. Furthermore, the technical thought which can be grasped from said operation gestalt is indicated below.

[0060] (1) Said active principle is a red grape extract according to claim 1 or 2 characterized by being what extracted from at least one sort chosen from the pericarp and the kind of a red grape.

[0061] Thus, when constituted, the content of an active principle can be raised easily.

(2) At least one sort chosen from the pericarp and the kind of said red grape is a red grape extract given in the above (1) characterized by using the residue in case red grape juice or red wine is manufactured, after squeezing fruit juice.

[0062] Thus, when constituted, since residue can come to hand in large quantities and cheaply, a red grape extract can be manufactured cheaply.

(3) The content of said polyphenol is a red grape extract given in either claim 2 characterized by being 60 - 80% of the weight of within the limits when it is made to dry and disintegration is carried out, the above (1) and the above (2).

[0063] Thus, when constituted, growth depressor effect or apoptosis inductive effect can be demonstrated much more effectively to a gun cell.

(4) Claim 2 characterized by containing the water-soluble minor constituent contained on a red grape, and a red grape extract given in either of the above (1) to the above (3).

[0064] Thus, when constituted, growth depressor effect or apoptosis inductive effect can be demonstrated still more effectively to a gun cell.

(5) Said active principle is claim 1 characterized by being what uses as a principal component the polyphenol from which the ethanol solubility component was removed, claim 2, and a red grape extract given in either of the above (1) to the above (4).

[0065] Thus, when are constituted, and it adds to drinkable preparations etc., the cause of non-melt generation can remove an ethanol solubility component effectively.

(6) Said active principle is claim 1 characterized by being what uses as a principal component the polyphenol which a non-melt does not generate when a component insoluble in water is removed and it is made to dissolve in water, claim 2, and a red grape extract given in either of the above (1) to the above (5).

[0066] Thus, when are constituted, and it adds to drinkable preparations etc., the component leading to non-melt generation can be removed effectively.

(7) The manufacture approach of the red grape extract which dries and is characterized by having carried out disintegration, having added ethanol to the powder, having made precipitation generate, and drying the precipitation after extracting an active principle and removing residue, adding and agitating water to the residue which squeezed the red grape and removed fruit juice.

[0067] Thus, when are constituted, and it adds to drinkable preparations etc., the red grape extract with which the cause of non-melt generation removed the ethanol solubility component effectively can be manufactured easily.

[0068] (8) The manufacture approach of the red grape extract characterized by making it dry after drying and carrying out disintegration, adding and agitating water to the powder further after extracting an active principle and removing residue, and removing a non-melt, adding and agitating water to the residue which squeezed the red grape and removed fruit juice.

[0069] Thus, when are constituted, and it adds to drinkable preparations etc., the red grape extract which removed the component leading to non-melt generation effectively can be manufactured easily.

[0070]

[Effect of the Invention] According to this invention, the following effectiveness is done so as explained in full detail above. According to the red grape extract of invention according to claim 1, a side effect can be reduced in being able to demonstrate growth depressor effect or apoptosis inductive effect to a gun cell.

[0071] According to the red grape extract of invention according to claim 2, in addition to an effect of

the invention according to claim 1, growth depressor effect or apoptosis inductive effect can be more effectively demonstrated to a gun cell.

[0072] According to the manufacture approach of the red grape extract invention according to claim 3, in being able to demonstrate growth depressor effect or apoptosis inductive effect to a gun cell, a red [ who can reduce a side effect ] grape extract can be manufactured easily.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] The graph which shows the result of a Homo sapiens stomach gun cell proliferation inhibition test.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

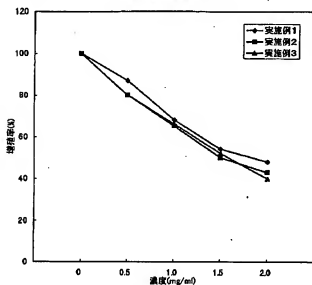
JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

## DRAWINGS

[Drawing 1]

ヒト胃ガン細胞増殖抑制効果



[Translation done.]